



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
学位記番号	第 1001 号
氏 名	社本 智也
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer (ゼルンボンは NF- $\kappa$ B 活性を介して膵癌血管新生を抑制する)  Pancreas. in press
論文審査担当者	主査： 岡本 尚 副査： 城 卓志, 竹山 廣光

### 【目的】

膵癌は悪性度の極めて高い癌であり、既存の化学療法および放射線療法の効果は十分といえず、より効果の高い治療法の開発が急務である。他の固形腫瘍と同様に膵癌の増殖、進行には血管新生が必要であり、抗血管新生療法は膵癌治療の一役を担う可能性がある。近年では、腫瘍血管を正常化することにより、併用する抗癌剤の効果を増強するという抗血管新生療法の新たなメカニズムも提唱されている。我々は転写因子 NF- $\kappa$ B が、血管新生に関わるサイトカイン発現に関与し、膵癌の血管新生および転移に大きく関わっていることを報告してきた。NF- $\kappa$ B は膵癌細胞において血管新生能と相関しており、重要な治療ターゲットと考えられる。しかしながら、骨髄腫などの治療に使用される bortezomib といった proteasome inhibitor は副作用が強く、膵癌でも臨床応用にはいたっていない。そこで我々は、従来の NF- $\kappa$ B inhibitor と同様に作用し、比較的安全に投与が可能である natural product のゼルンボンに着目した。ハナショウガ (*Zingiber zerumbet* Smith) の主成分であるゼルンボンは、抗炎症効果や抗腫瘍効果を有するとの報告があるが、そのメカニズムについてはまだ十分解明されていない。今回ゼルンボンの NF- $\kappa$ B 活性を介した膵癌血管新生抑制効果を検討する。

### 【方法】

膵癌細胞株の BxPC-3 および MIA PaCa-2 を用いて、以下の実験を行った。

- ①膵癌細胞の増殖に及ぼすゼルンボンの影響を、WST-1 assay を用いて検討した。
- ②ゼルンボン刺激による NF- $\kappa$ B 活性の変化を NF- $\kappa$ B (p65) Transcription Factor Assay Kit を用いて測定した。MIA PaCa-2 は、NF- $\kappa$ B 活性が低いことより、TNF- $\alpha$  で NF- $\kappa$ B を強発現した条件下でも、ゼルンボンの効果を同様に検討した。
- ③NF- $\kappa$ B 活性の変化に伴う血管新生因子 (VEGF・IL-8) の発現の変化を RT-PCR および ELISA で測定した。
- ④膵癌細胞、線維芽細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を共培養した *in vitro* angiogenesis assay を用いて、HUVEC の管腔形成能に及ぼすゼルンボンの効果を検討した。

### 【結果】

- ①膵癌細胞株において、NF- $\kappa$ B が血管新生因子の発現に関与していることを再確認した。
- ②ゼルンボンは高濃度 (25  $\mu$ M 以上) で膵癌細胞増殖を抑制した。
- ③NF- $\kappa$ B 活性はゼルンボン投与により有意に抑制され、TNF- $\alpha$  で NF- $\kappa$ B をさらに強発現した条件下でも有意に抑制した。
- ④膵癌細胞からの VEGF および IL-8 分泌量は、ともに低濃度のゼルンボン投与により有意に低下した。
- ④癌細胞との共培養によって増強した HUVEC の管腔形成能を、ゼルンボンは低濃度で有意に抑制した。

【結語】膵癌細胞は、NF- $\kappa$ B 活性を介して血管新生因子である VEGF・IL-8 の分泌を制御しており、ゼルンボンはこれを低濃度で抑制した。ゼルンボンは膵癌の腫瘍血管新生を抑制し、新たな膵癌治療の一役を担う可能性があると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

膵癌は悪性度の高い癌であり既存の化学療法や放射線療法の効果は十分といえず、新たな治療法の開発が急務である。他の固形腫瘍と同様に膵癌の増殖、転移には血管新生が必要であり、抗血管新生療法は膵癌治療の一役を担う可能性がある。申請者の属する教室では転写因子 NF- $\kappa$ B が血管新生に関わるサイトカイン発現に関与し、膵癌の血管新生および転移に大きく関わっていることを報告してきた。NF- $\kappa$ B は膵癌細胞で血管新生能と相関しており重要な治療ターゲットと考えられる。しかしながら、骨髄腫などの治療に使用される bortezomib などの proteasome inhibitor は副作用が強く、膵癌では臨床応用に至っていない。そこで、従来の NF- $\kappa$ B 阻害剤と同様に作用し、比較的安全に投与が可能である天然物由来のゼルンボンに着目した。ハナショウガ (*Zingiber zerumbet* Smith) の主成分であるゼルンボンは、NF- $\kappa$ B シグナルを介して抗炎症効果や抗腫瘍効果を有するとの報告があるが、そのメカニズムはまだ十分には解明されていない。そこで、膵癌細胞におけるゼルンボンの NF- $\kappa$ B 活性を介した血管新生抑制効果を検討した。以下に結果の要点を示す。

①膵癌細胞株 BxPC-3 と MIA PaCa-2 を用い、NF- $\kappa$ B が血管新生因子 VEGF および IL-8 の発現および血管新生能に関与していることを示した。②ゼルンボンが高濃度 (25  $\mu$ M 以上) で BxPC-3 の増殖を抑制することを、WST-1 assay を用いて示した。③NF- $\kappa$ B (p65)転写因子測定系を用いて NF- $\kappa$ B 活性がゼルンボン投与により有意に抑制され、TNF- $\alpha$  で NF- $\kappa$ B 活性をさらに誘導した条件下でも有意に抑制することを示した。④膵癌細胞からの VEGF および IL-8 の発現と分泌量が低濃度のゼルンボン投与により有意に低下することを RT-PCR および ELISA にて示した。⑤膵癌細胞、線維芽細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をダブルチャンバー法により共培養した *in vitro* angiogenesis assay を用いて癌細胞との共培養によって増強した HUVEC の管腔形成能を調べたところゼルンボンは低濃度で有意に抑制した。

以上より、膵癌細胞は、NF- $\kappa$ B 活性を介して血管新生因子である VEGF・IL-8 の分泌を制御しており、ゼルンボンはこれらを低濃度で抑制することが示された。近年では、腫瘍血管を正常化することにより、併用する抗癌剤の効果を増強するという抗血管新生療法の新たなメカニズムも提唱されており、ゼルンボンは新たな膵癌治療の一役を担う可能性があると考えられた。

学位審査では、15 分ほど論文内容が説明された後、質疑がなされた。

まず、第 1 副査の城教授より、(1) NF $\kappa$ B が、膵癌の血管新生のキーファクターであるかはどのように示したか？(2) NF $\kappa$ B をブロックした実験はされていないのか？(3) Vivo の実験は今後予定しているか？など 13 項目の質問がされた。

主査である私(岡本)からは(1)ゼルンボンの抗がん作用から血管新生阻害効果に思い至った経緯を述べよ。(2)NF $\kappa$ B の活性化には構成的と誘導型とがあるが、膵癌ではどちらのタイプが多かったのか？(3)膵がんの治療戦略に NF $\kappa$ B が分子標的になるために解明される必要があるかことは何か？など、16 項目の質問をした。

第 2 副査の竹山教授からは専門分野として、(1)膵癌の標準的治療について、(2)膵臓の鏡視下手術のについて、(3)積極的抗炎症脂質メディエーター、リゾルビン、は、がんの効果があるか？、など 3 項目の質問がされた。

一部、返答に窮することもありましたが、おおむね良好な解答であった。

本研究によって、ゼルンボンが NF- $\kappa$ B 活性を介して、膵癌血管新生を抑制するという新たな知見を得た。よって本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判断した。